



ISSN: 2525-815X

Journal of Environmental Analysis and Progress

Journal homepage: www.jeap.ufrpe.br/

10.24221/jeap.3.1.2018.1705.092-099



Bioprospecção de leveduras oleaginosas do Agreste Pernambucano: síntese de lipídios para a produção de biodiesel a partir do resíduo glicerol bruto

Bioprospecting of oleaginous yeasts from the Agreste of Pernambuco: synthesis of lipids to produce biodiesel from the crude glycerol residue

Tayane de Cássia Dias Mendes-Silva^{a,b}, Naiara Priscila Silva Reis Barbosa^a, Esteban Espinosa Vidal^a

^a Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Grupo Biotecnologia de Branca, Laboratório de Bioprocessos, Recife-PE, Brasil, CEP: 50.740-540. E-mail: nayaprisa@gmail.com; esteban.espinosa.vidal@gmail.com.

^b Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Recife-PE, Brasil, CEP: 50670-90. E-mail para correspondência: tayanecassiamendes@gmail.com.

ARTICLE INFO

Recebido 10 Nov 2017
Aceito 22 Jan 2018
Publicado 30 Jan 2018

ABSTRACT

Biodiesel represents a renewable, sustainable and environmentally safe alternative to fossil fuels. The industrial production of biodiesel, however, leads to obtaining large quantities of glycerol as a by-product, therefore, new applications are sought for this residue. Recently, has been studied the use of oleaginous yeasts as promising source of lipids for biodiesel production, they display high growth rate, assimilating several carbon sources as crude glycerol. The study investigated the ability of novel *Yarrowia lipolytica* isolates to accumulate lipids, using crude glycerol as the only carbon source. Ten isolates collected from a Dairy of the Agreste-PE, identified by MALDI-TOF as *Y. lipolytica*, were cultivated and determined the growth kinetics. In all strains, the maximum cell growth was reached in 28 hours. Total lipid production was on average $25 \pm 6.3 \text{ mg.g}^{-1}$. The highest yield was obtained by isolated CTN-0008 (37.73 mg.g^{-1}). The results found that new *Y. lipolytica* isolates from Pernambuco Agreste can accumulate lipids using crude glycerol as the only source of carbon. Also, indicating the isolate CTN-0008 is a promising isolate for use in optimization of lipid production conditions for biodiesel production purposes.

Keywords: Biofuels, bioproduction, *Yarrowia lipolytica*, agroindustrial waste.

RESUMO

O biodiesel representa uma alternativa renovável, sustentável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis. A produção industrial de biodiesel, contudo, leva a obtenção de grandes quantidades de glicerol como um subproduto, portanto, buscam-se novas aplicações para este resíduo. O uso de leveduras oleaginosas vem sendo estudado por serem promissoras fonte de lipídeos para produção de biodiesel, têm alta taxa de crescimento, podendo assimilar diversas fontes de carbono, como o glicerol bruto. O estudo investigou a capacidade de isolados inéditos de *Yarrowia lipolytica* para acumular lipídios, utilizando glicerol bruto como única fonte de carbono. Dez isolados coletados de Laticínios da Bacia do Agreste-PE, identificadas por MALDI-TOF como *Y. lipolytica*, foram cultivados e determinada a cinética de crescimento. Para todas as linhagens, o máximo crescimento celular foi atingido em 28 horas. A produção de lipídeos totais foi em média $25 \pm 6,3 \text{ mg.g}^{-1}$, no entanto a maior produção foi obtida pela linhagem *Y. lipolytica* CTN-0008 ($37,73 \text{ mg.g}^{-1}$). Os resultados comprovaram que os novos isolados de *Y. lipolytica*, no Agreste de Pernambuco, têm a capacidade de acumular lipídios empregando como única fonte de carbono glicerol bruto, indicando a linhagem CTN-0008 como promissora em relação às outras linhagens, e sugerindo sua utilização para otimização de condições de produção de lipídeos totais a partir do glicerol bruto para fins de produção de biodiesel.

Palavras-Chave: Biocombustível, bioprodução, *Yarrowia lipolytica*, resíduos agroindustriais.

Introdução

A produção de biodiesel tem aumentado nos últimos anos por se tratar de um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Durante o processo, um dos principais subprodutos gerados é o glicerol bruto, resíduo que apresenta um alto teor de impurezas, e que devido ao excessivo custo, torna inviável a sua purificação para outros usos industriais.

A raiz deste, vários estudos foram desenvolvidos diante da possibilidade de usar o glicerol bruto como fonte de carbono de leveduras oleaginosas (leveduras com mais de 20% de lipídios na massa seca) para crescimento de biomassa microbiana (Raimondi et al., 2014; Yen et al., 2015) e produção de ácido cítrico e lipídios (Souza et al., 2014; Yen et al., 2015).

Neste sentido, os lipídios provenientes de leveduras oleaginosas poderiam atuar como fonte alternativa de matéria prima na produção de biodiesel. É possível reduzir os custos e aumentar a competitividade econômica (Chunkeng et al., 2011). Muitas vantagens estão envolvidas no uso de leveduras oleaginosas para a produção de lipídios, como a alta taxa de crescimento em biorreatores, a capacidade de assimilar diversas fontes de carbono e não serem afetadas por limitações de espaço, clima ou variações de luz (Ami et al., 2014). Entre as leveduras mais citadas na literatura, como oleaginosas, figuram as do gênero *Rhodotorula* e da espécie *Yarrowia lipolytica* (Chen et al., 2009; Signori et al., 2016).

Yarrowia lipolytica é uma levedura aeróbia, da classe dos ascomycetes e subclasse hemiascomycetes. Essa levedura é frequentemente associada a substratos hidrofóbicos, como meios poluídos com óleos, podendo ser isolada de produtos lácteos (Nicaud, 2012). *Yarrowia lipolytica* pode acumular lipídios, até 40% do peso seco de células, e ácido linoleico em mais de 50% do total de ácidos graxos (Ratledge & Wynn, 2002). Os estudos mostram o potencial biotecnológico desta espécie quanto à produção de enzimas, ácido cítrico e consumo de oleatos, alcanos, ácidos graxos e glicerol bruto (Silva et al., 2010; Belo, 2013; Souza et al., 2014, Sara et al., 2016).

Neste contexto, o estudo objetivou avaliar a capacidade da levedura *Y. lipolytica* isolada dos laticínios da bacia do Agreste, em Pernambuco, para acumular lipídios adequados para a produção de biodiesel, utilizando glicerol bruto como única fonte de carbono.

Material e Métodos

Isolados de leveduras

Neste estudo foram estudados 10 isolados (CTN-07 a CTN-22) correspondentes a levedura *Y. lipolytica*. Os isolados foram coletados no Laticínio artesanal do sítio Uma do Simão (Latitude: S 08°01'04,3" e Longitude: WO 34°56'56,7"), da bacia de laticínios do Agreste, em Garanhuns-PE, Brasil.

Identificação por MALDI-TOF

Os isolados foram identificados extraíndo as proteínas totais pelo método do ácido fórmico, e analisando o perfil proteico utilizando a técnica *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization Time of Flight* (MALDI-TOF), no espectrômetro de massa Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF (Bruker Daltonics). O sistema emprega um laser de nitrogênio (337 nm), e foi ajustado o limite de detecção m/z de 2,0 para 20,0 kDa. A identificação foi realizada por comparação com espectros-referência contidos na biblioteca de espectros da plataforma MALDI Biotyper. O sistema estipula valores de \log (*score*) para identificação de espécies e gêneros. Após análise, a pontuação obtida para cada isolado é situada dentro de um intervalo que determina o grau da identificação até o nível de gênero ou espécie (Murray, 2012).

Pré-cultura

Os isolados foram pré-cultivados em frascos erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do meio sintético YSG, empregando glicerol bruto como única fonte de carbono (extrato levedura 10 g.L⁻¹, sulfato de amônio 5 g.L⁻¹, 20 g.L⁻¹ glicerol bruto, cloranfenicol 6 mg.mL⁻¹ e amoxicilina 0,2 mg.mL⁻¹). O glicerol bruto foi obtido a partir da síntese do biodiesel proveniente da Usina Experimental Piloto Caetés (PE), unidade pertencente ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). As condições da cultura foram agitação de 250 rpm., durante 24 h a 28°C com pH inicial de 6,8.

Cinética de crescimento

Após determinar a Densidade Óptica (DO_{600nm}) do pré-inóculo, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada estéril. As curvas de crescimento dos isolados foram determinadas em erlenmeyers de 250 mL, com volume de 125 mL, empregando um inóculo celular de 0,5 (DO_{600nm}), durante 72 h a 28°C, e agitação de 250 rpm. As amostras (5,0 mL) foram coletadas em diferentes intervalos, para a determinação da DO.

Extração de Lipídios totais

A biomassa celular foi lavada com água destilada estéril e liofilizada por 48 h. Para a extração de lipídios foi usado o método de Bligh & Dyer (1959), com modificações. Uma alíquota de 0,6 g da biomassa celular liofilizada foi adicionada à 12 mL de uma solução de clorofórmio e metanol (1:1 v/v). As amostras foram submetidas ao ultrassom (USC-800/55 KHz) por 15 minutos e, em seguida, misturadas em vortex por 2 minutos (duas vezes). Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 r.p.m., quando o sobrenadante (aprox. 9 mL) foi recuperado. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL de água bidestilada, e as amostras foram submetidas a 2 minutos de vortex, adicionando 6 mL de clorofórmio e voltando novamente ao vortex por 2 min. Finalmente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 r.p.m. e transferidas para um funil de separação (1h). Em seguida, foi coletada a fase inferior apolar (lipídeos) e transvasada para tubos previamente pesados (W1). As amostras foram secas com gás nitrogênio e pesadas novamente (W2). A Equação 1 foi utilizada para o cálculo da porcentagem de lipídios totais nas amostras.

$$\text{Lipídios totais (\%)} = \frac{(W2-W1)}{0,6} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Transesterificação

Nos tubos contendo os lipídios totais extraídos foram adicionados 0,5 mL de uma solução de KOH metilado e levados ao vortex por 2 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL de hexano (vortex por 2 minutos) em solução de NaCl 0,1% (2 minutos). Em seguida, as amostras foram centrifugadas, por 6 minutos, a 4000 r.p.m. A fase superior foi retirada e filtrada para análise no GC-FID.

Cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama (CG-FID)

As análises de ácidos graxos foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Modelo 7890A Agilent Technologies) equipado com injetor (Agilent Technologies, 10 µL, "split-splitless") e um detector por ionização de chama (FID). Utilizou-se coluna capilar DB-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent J & W Scientific), com injeção com divisor (1:100) e hélio como gás de arraste (1 mL.min⁻¹). Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: temperatura do injetor de 300°C, temperatura inicial do forno

de 150°C durante 4 minutos, com posterior taxa de aquecimento de 4°C por minuto, até 280°C, mantido a 280°C por 5 minutos. A temperatura do detector foi de 300°C, a vazão do ar sintético de 400 mL.min⁻¹, do nitrogênio de 25 mL.min⁻¹ e do hidrogênio de 30 mL.min⁻¹. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram identificados, por comparação, com o tempo de retenção do padrão FAME MIX (C4-24 Supelco) e quantificados para a normalização percentual da área do pico.

Obtenção do perfil de proteínas de isolados de *Yarrowia lipolytica* e conformação do banco de dados

Os espectros proteicos obtidos no método de identificação dos isolados foram transformados em dados tabulados no formato CVS, através da transformação da intensidade dos sinais *m/z* dos espectros de massa de proteínas no intervalo de 2,0 a 20,0 kDa. Os dados foram agrupados e organizados na plataforma Excel constituindo um banco de dados do perfil proteico para cada isolado. Foi realizada a detecção de picos biomarcadores através da comparação da lista de sinais *m/z* entre as linhagens analisadas, sempre considerando uma variação de massa de ± 5 Da.

Análise multivariada

Os bancos de dados dos perfis proteicos, correspondentes à espécie de levedura *Y. lipolytica*, foram analisados por ferramentas de análise multivariada para determinar correlações por *Principal Component Analysis* (PCA), e de agrupamento por construção de um dendrograma no Origin 8.0, como método de agrupamento foi utilizado o de *Group average*. Ambas as análises resultaram complementares, e basearam-se em análise de correlação do perfil de proteínas dos isolados. Os isolados CTN-01 Sc (*Saccharomyces cerevisiae*) e CTN-34 Ct (*Candida tropicalis*) foram utilizados como não filogeneticamente relacionados.

Resultados

Ao analisar a cinética de crescimento, observou-se que todos os isolados de *Y. lipolytica* ensaiados foram capazes de assimilar e crescer empregando glicerol bruto como única fonte de carbono. A fase de crescimento exponencial foi atingida às 28 horas (O.D. = 5-7), não apresentando diferenças significativas entre os isolados (Figura 1). Ao contrário do esperado para o glicerol bruto, e considerando a presença de possíveis inibidores do crescimento (por exemplo, traças do catalisador), esta levedura apresentou-se

como uma fonte de carbono adequada para a produção de biomassa celular.

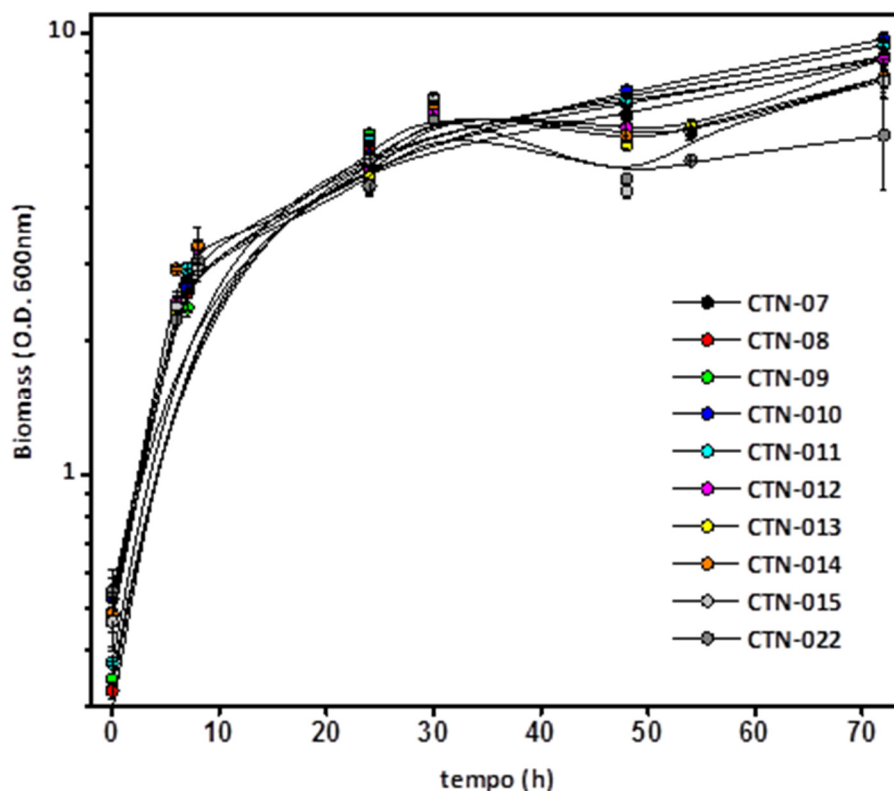
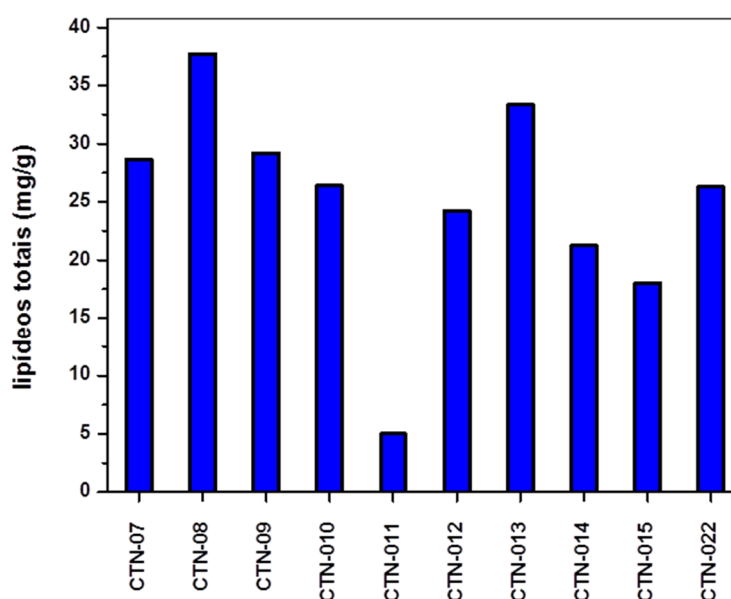


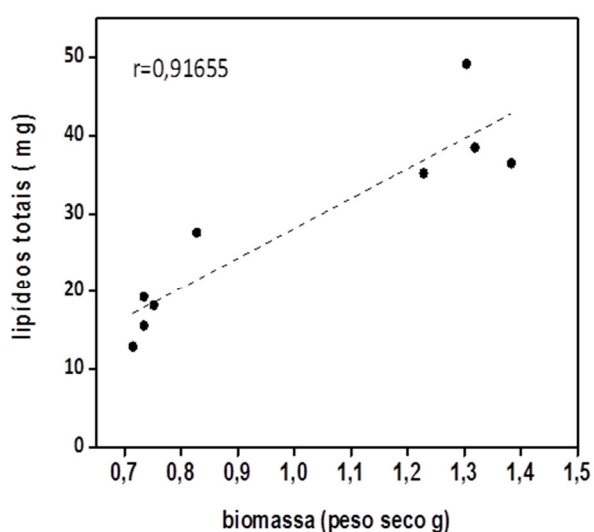
Figura 1. Cinética de crescimento de isolados de *Yarrowia lipolytica* em meio contendo glicerol bruto.

A partir das células obtidas após 72 h de crescimento, foi possível realizar a extração de lipídeos totais. A produção de lipídeos foi em média de $25 \pm 6,3 \text{ mg.g}^{-1}$ (lipídios/peso seco celular). Os isolados de *Y. lipolytica* CTN-08 e CTN-13 destacaram-se na produção de lipídeos, atingindo um valor de 48% e 22%, respectivamente, por encima da meia

($37,73 \text{ mg.g}^{-1}$ e $33,35 \text{ mg.g}^{-1}$) (Figura 2a). Para determinar a existência de uma relação positiva entre a biomassa celular e a produção de lipídeos foi realizada uma análise comparando estes parâmetros (Figura 2b). O estudo mostrou que a produção de lipídeos totais é diretamente proporcional à produção de biomassa ($r = 0,916$).



(a)



(b)

Figura 2. Produção de lipídeos totais. (a) Produção de lipídeos totais (mg.g^{-1}), a partir de dez isolados de *Yarrowia lipolytica*; (b) Relação entre os lipídeos totais (mg) e a biomassa (g).

A composição de ácidos graxos, em percentual, resultou similar para todos os isolados de *Y. lipolytica*, destacando-se o ácido insaturado oleico (C18:1), com $50,1 \pm 1,75\%$, o ácido linoleico (C18:2), com $19,97 \pm 1,97\%$, e o ácido palmitoleico (C16:1), com $11,65 \pm 2,07\%$ (Figura

3). Foi advertido que o perfil de ácidos graxos obtido pelos isolados de *Y. lipolytica* resulta similar ao de óleos vegetais, como o de soja, e adequado (percentual majoritário de C16-C18) ao recomendado para a produção de biodiesel.

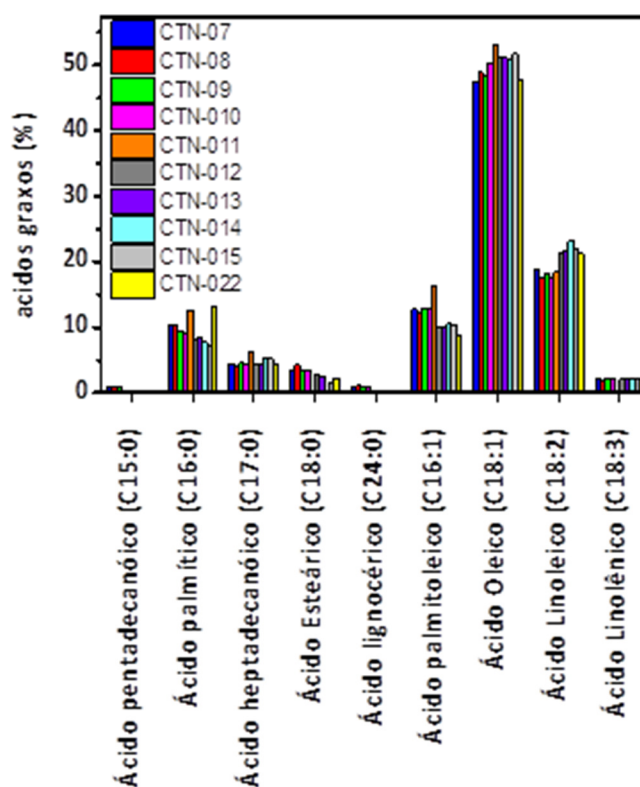
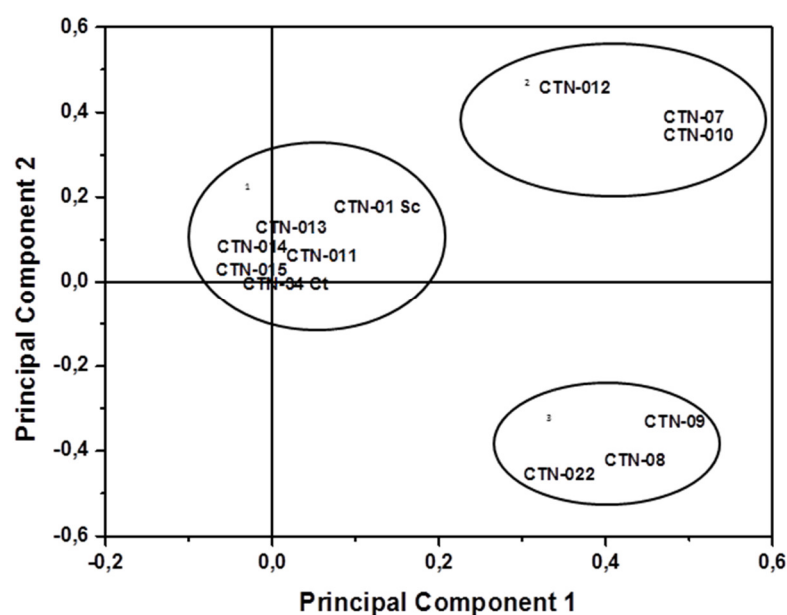


Figura 3. Perfil de ácidos graxos de *Yarrowia lipolytica*.

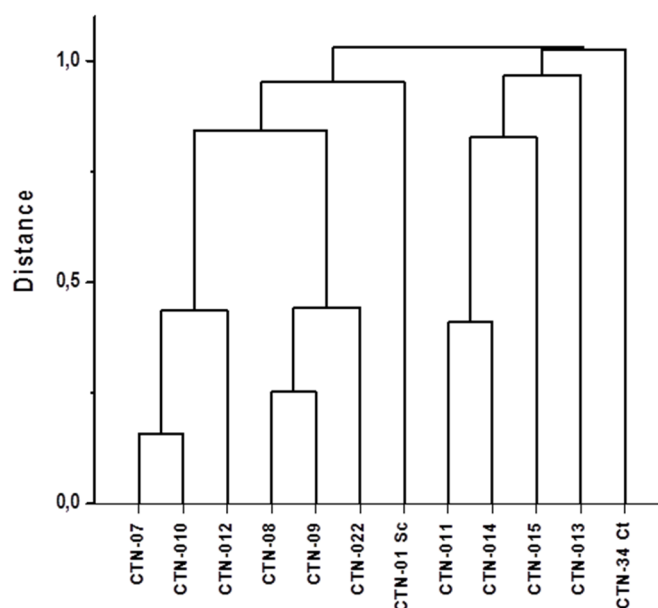
Considerando que os isolados de *Y. lipolytica* foram coletados em um mesmo laticínio, e que a identificação por MALDI-TOF não permite discriminar entre linhagens de uma mesma espécie, resulta adequado avaliar se os isolados se tratam de uma ou várias linhagens diferentes. Para determinar essa possibilidade, realizou-se uma análise proteômica multivariada (PCA e *Cluster*), empregando os perfis obtidos de proteínas.

A Figura 4a mostra a tendência de discriminação dos isolados em três grupos de *Y.*

lipolytica. Foi observado um grupo de isolados (CTN-11/13/14/15) com pouca correlação entre eles, e com os isolados não-*Y. lipolytica*, como CTN-01 Sc (*S. cerevisiae*) e CTN-34 Ct (*C. tropicalis*) (Grupo 1). Também foi confirmado que os isolados CTN-07/10/12 (Grupo 2) apresentaram-se com alto nível de correlação entre eles, assim como os isolados CTN-08/09/22 (Grupo 3). Como consequência, os isolados do Grupo 2 podem se tratar de uma mesma linhagem, diferente dos isolados pertencentes ao Grupo 3.



(a)



(b)

Figura 4. Análise multivariada. (a) Análise de PCA; (b) Análise hierárquica de agrupamento: dendograma.

Para confirmar esse estudo comparativo, foi realizada uma análise de agrupamentos hierárquicos, com o propósito de revelar algum tipo de interação mais específica. A análise apresentou novamente os isolados CTN-07/10/12 e CTN-08/09/22 como fortemente correlacionadas entre si, respectivamente (Figura 4b). Desta maneira, podemos indicar a presença de dois grupos de isolados que poderiam ser considerados como duas linhagens de *Y. lipolytica* diferentes.

Discussão

O gênero *Yarrowia* é conhecido na literatura por sua capacidade de acumular lipídios (Chen et al., 2009; Signori et al., 2016). Este estudo comprovou que todos os isolados de *Yarrowia* coletados nos laticínios da bacia do Agreste-PE apresentaram potencial de crescimento e de acúmulo de lipídios, utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono.

Neste sentido, o glicerol bruto vem sendo estudado como fonte de carbono para o crescimento de biomassa microbiana, produção de biodiesel e outros compostos como o ácido cítrico (Souza et al., 2014; Yen et al., 2015). Porém, o glicerol bruto apresenta possíveis inibidores do crescimento, como traças dos reagentes e do catalisador do processo de biodiesel (metanol e KOH), o que tem produzido inconvenientes, com rendimentos menores de crescimento celular, comparado ao glicerol purificado (Silva, Mack & Contiero, 2009). Ao contrário do esperado, neste estudo foi possível indicar o glicerol bruto como uma fonte de carbono adequada para a produção de biomassa celular, com perspectivas de otimização do processo fermentativo. Possivelmente, tratando-se de uma usina experimental, o glicerol bruto é submetido a recuperação dos reagentes, resultando em um teor de contaminantes baixo.

Em relação à qualidade dos lipídeos produzidos pelos isolados de *Y. lipolytica*, considera-se que um percentual majoritário dos ácidos graxos de C16, C18 e C20 é adequado para a produção de biodiesel. Desta forma, foi observado que o perfil de ácidos graxos obtido pelos isolados de *Y. lipolytica* resultam apropriados.

Visto que os isolados do gênero *Yarrowia* apresentam curvas de crescimento e de percentuais de produção de ácidos graxos similares nas condições avaliadas, não seria possível discriminá-los em linhagens. Essa similaridade, possivelmente resultante das semelhanças fisiológicas, visto se tratarem de um mesmo gênero taxonômico e terem sido isoladas

em um mesmo ambiente. Porém, a partir da análise multivariada do perfil proteico foi possível indicar que existem duas linhagens diferentes de *Y. lipolytica*. O perfil proteico apresenta, *per si*, uma coleção maior de informação que os valores de percentual de ácidos graxos, tornado esta análise bem mais robusta. Igualmente, seria necessário a realização de análises complementares, como, por exemplo, através de sistema de cromatografia acoplado à espectrometria de massa, para corroborar esta pressuposição.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo mostram a potencial aplicação de um processo biotecnológico, utilizando um resíduo industrial como o glicerol bruto, para a produção de biomassa na forma de leveduras. Esses resultados apontam uma alternativa às tradicionais, sendo uma estratégia sustentável para diminuir o acúmulo desse resíduo no meio ambiente, reduzindo os problemas de cunho ecológico, além de agregar valor ao setor. Além disso, ainda existem poucos estudos empregando glicerol residual, estimulando, deste modo, a abertura de campos de investigação nesta área de conhecimento, no contexto da biorrefinaria. Este estudo representa o desenvolvimento de um processo altamente desejável para o aproveitamento do glicerol excedente no mercado.

Conclusão

A indústria de laticínios se apresenta como um local idôneo para a procura de leveduras oleaginosas. Os novos isolados de *Y. lipolytica* têm a capacidade de acumular lipídios empregando como única fonte de carbono o glicerol bruto. Neste estudo, o glicerol bruto apresenta-se como uma fonte adequada para a produção de biomassa celular. Foi possível indicar que dos isolados obtidos, existem duas linhagens de *Y. lipolytica* definidas. O isolado CTN-0008 foi considerado promissor, sugerindo sua utilização para otimização de condições de produção de lipídeos totais a partir do glicerol bruto, para fins de produção de biodiesel.

Agradecimentos

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste estudo e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo. À pesquisadora Joselma Silva (CETENE) pela colaboração científica através de auxílio nas

identificações dos isolados, e a Katarynna Santos pelo análise no GC-FID.

Referências

AMI, D.; POSTERI, R.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; DOGLIA, S. M.; BRANDUARDI, P. 2014. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Biotechnol Biofuels*, v. 7, n. 12, p. 1-14.

BELO, I. 2013. *Yarrowia lipolytica*: um fábrica celular no contexto de biorrefinaria. *Boletim sociedade portuguesa de biotecnologia*, v. 2, n. 3, p. 21-23.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Physiology. Pharmacol.*, v. 37, p. 911-917.

CHEN, X.; LI, Z.; ZHANG, X.; HU, F.; RYU, D. D. Y.; BAO J. 2009. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 159, p. 591-604.

CHUNKENG, H. U.; QING Q. I. N.; PEIPEI G. A. O. 2011. Medium Optimization for Improved Ethanol Production in Very High Gravity Fermentation. *Chin. J. Chem. Eng.*, v. 19, n. 6, p. 1017-1022.

MURRAY, P. R. 2012. Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn.*, v. 14, p. 419-423.

NICAUD, J. M. 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, v. 29, n.10, p. 409- 418.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 113, p. 1031-1051.

RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M. M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. 2014. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. *Microbial Cell Fact.*, v. 13, n. 1, p. 83-93.

RATLEDGE, C.; WYNN J. P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 51, p. 1-51.

SARA, M.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. 2016. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* grown on biodiesel-derived crude glycerol: optimization of growth parameters and their effects on the fermentation efficiency. *RSC Advances*, v. 6, n. 93, p. 90547-90558.

SILVA, C. C. de A. 2015. Caracteres de Resiliência e Usos Antrópicos em Espécies Vegetais da Caatinga. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brasil. 123p.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, n. 1, p. 30-39.

SILVA, L. V. 2010. Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos-EQ. Rio de Janeiro, Brasil. 94p.

SIGNORI, L.; AMI, D.; POSTERI, R.; GIUZZI, A.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; BRANDUARDI, P. 2016. Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microb Cell Fact.*, v. 15, n. 1, p. 75-93.

SOUZA, K. S.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. 2014. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. *Am. J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 24, n. 4, p. 497-506.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. 1998. *Química Nova*, v. 21, p. 551-556.

YEN, H. W.; LIAO, Y. T.; LIU, Y. X. 2015. The growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an airlift bioreactor on crude glycerol through a non-sterile fermentation process. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 38, n. 8, p. 1541-1546.